AUS DEM INSTITUT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
Direktor: Professor Dr.Dr. Wilh. Zimmermann

Vergleichende Keimzahlbestimmungen von Wässern mit dem Plattenguẞverfahren unter Anwendung verschiedener Medien und Bebrütungstemperaturen.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1969

vorgelegt von

Horst LAUTERBACH

Dekan: Professor Dr. H. WITTER

Referent: Professor Dr.Dr.Wilh.ZIMMERMANN

1969

AUS DEM INSTITUT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
Direktor: Professor Dr.Dr. Wilh. Zimmermann

Vergleichende Keimzahlbestimmungen von Wässern mit dem Plattengußverfahren unter Anwendung verschiedener Medien und Bebrütungstemperaturen.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Horst LAUTERBACH

Dekan: Professor Dr. H. WITTER

Referent: Professor Dr.Dr.Wilh.ZIMMERMANN

1 9 6 8

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die Promotionsprüfung fand statt am 6. Februar 1969.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINFÜHRUNG IN DAS THEMA	3
Entwicklung und Problematik der kulturellen Keimzahlbestimmungen	
FRAGESTELLUNG	22
METHODIK	24
EXPERIMENTELLER TEIL	28
DISKUSSION DER ERGEBNISSE	46
ZUSAMMENFASSUNG	54
SCHRIFTTUM	56

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542718_0030

EINFÜHRUNG IN DAS THEMA

Entwicklung und Problematik der kulturellen Keimzahlbestimmungen.

In natürlichen Wässern beliebiger Herkunft sind stets Mikroorganismen in wechselnd hoher Zahl enthalten. Will man Aussagen über die Zahl der Individuen machen, so gibt es dafür generell zwei Methoden.

Für die direkte Erfassung der Keime hat P.Th. MÜLLER im Jahre 1912 eine Methode der Zählung im mikroskopischen Präparat angegeben, welche auf mechanischer Anreicherung der Keime durch ein Ausfällungsverfahren beruht, da eine unmittelbare Auszählung in dem unvorbehandelten Wasser, etwa mittels der Zählkammer oder des gefärbten Ausstrichpräparates wegen der geringen Zahl der Bakterien, abgesehen von sehr stark verunreinigten Wässern bzw. Abwässern, praktisch nicht in Betracht kommt. Die Nachteile dieses Verfahrens liegen auf der Hand, de nn im mikroskopischen Präparat kann zwischen lebenden und nicht mehr vermehrungsfähigen Bakterien nicht unterschieden werden. Der Anwendungsbereich der mikroskopischen Keimzahlbestimmung wurde in neuerer Zeit durch die Kapillartechnik von COLLINS u. KIPLING (1957) und die Membranfiltermethode von JANNASCH (1958) erweitert.

Die lebenden Bakterien allein zu erfassen, ist durch die Kulturmethode möglich, nachdem R. KOCH (1881) die von ihm erarbeitete Gelatineplattenmethode auf die Untersuchung des Trinkwassers ausgedehnt hatte. Sie beruht darauf, daß lebende Keime auf festen Nährböden Kolonien bilden und als solche sicht- und zählbar werden. Die Wasserprobe wird unter sterilen Kautelen mit dem durch Erwärmen verflüssigten Gelatinemedium vermischt und dann in eine Petrischale ausgegossen. In der Praxis wurde das Verfahren dahingehend modifiziert, daß die Mischung von Kulturmedium und Wasserprobe erst in der Petrischale erfolgt. Zur Auswertung des Plattenverfahrens war anfangs die Verdünnungsmethode üblich, bei der im Reihenversuch durch Aussaat fallender Mengen des zu untersuchenden Wassers in flüssige, sich dann verfestigende Nährböden diejenige kleinste Menge ausgesucht wird, die sich bei der Aussaat noch als keimhaltig erweist. Die Keimzahl, umgerechnet auf einen ml Wasser, ergibt sich durch Multiplikation als der reziproke Wert derjenigen Verdünnung, bei der die Aussaat eben noch ein positives Ergebnis liefert. Da diese Art der Bestimmung ungenau ist, wird sie heute nur noch in abgeänderter Form für die Bestimmung des

Colititers und bei Untersuchung von Abwasser und Oberflächenwasser angewandt. Zur Keimzahlbestimmung von Grundwasser geht man heute derart vor, daß man 1 ml der zu untersuchenden Wasserprobe mit dem verflüssigten Nährboden vermischt, erstarren läßt und die Zahl der auf ihm gewachsenen Kolonien auszählt.

Hierbei geht man von verschiedenen Voraussetzungen aus: erstens, daß jede Kolonie aus einem einzelnen Keim und nicht aus einer Zusammenballung mehrerer Bakterien entsteht, wie man sie tatsächlich im mikroskopischen Präparat sehen kann, und zweitens, daß unter den gewählten Kulturbedingungen, welche durch die Art des Nährbodens, der gewählten Temperatur und der Dauer der Bebrütung gegeben sind, auch wirklich alle Keime zu sichtbaren Kolonien auswachsen. Diese Voraussetzungen wurden in zufriedenstellender Weise als erfüllt angesehen, wenn man die zu untersuchende Wasserprobe schüttelte, um die eventuell in Klumpen vorliegenden Bakterien voneinander zu lösen, und als Kulturmedium Fleischwassergelatine benutzte, die bei Temperaturen von 22°C bebrütet werden mußte, um eine

Verflüssigung des Nährbodens zu verhindern.

Der KOCH'sche Nährboden hatte folgende Zusammensetzung (zitiert nach HEIM, 1894):

Fleischwasser	1ooo ml
Gelatinetafeln	1oo g
Pepton	1o g
NaCl	5 g

Neutralisieren, dann alkalisieren mit 1,5 g Natriumcarbonat.

ABBA (19oo) empfahl für die Keimzahlbestimmung in Wasser folgenden Nährboden:

Fleischextrakt	6 g
Fischleim	15o g
Wasser	1ooo ml

Neutralisieren, dann alkalisieren mit o,5 g Natriumcarbonat.

THOMANN (19oo) variierte den KOCH'schen Nährboden wegen der unterschiedlichen Beschaffenheit des dabei verwendeten Fleisches. Er gab folgendes

Rezept an:

Liebig's Fleischextrakt	6	g
Witte Pepton	1o	g
NaCl	5	g
Dikaliumphosphat	2	g
Aqua dest.	1ooo	ml
Gelatine	1oo-2oo	g

Neutralisieren, dann alkalisieren mit 1,5 g Kristallsoda.

HEIM (1894) und NEISSER (1895) fanden als erste, daß sich hinter dem Begriff der Keimzahl eine anfangs nicht geahnte Problematik verbirgt, daß die Keimzahl nämlich nicht einfach die Zahl aller im Wasser enthaltenen Bakterien angibt. Sie wiesen darauf hin, daß auf der verwendeten Nährgelatine keineswegs alle Keime zur Koloniebildung kommen (HEIM 1894), bzw. daß manche Kolonien nur mit dem Mikroskop sichtbar gemacht werden können (NEISSER 1895).

HESSE und NIEDER (1898), deren besonderes Ziel es war, eine möglichst große Zahl der im Wasser enthaltenen Bakterien als Kolonie sichtbar zu machen, stellten

fest, daß saure, alkalische und Kochsalz oder Fleischbrühe enthaltende Nährböden dem Erhalt einer möglichst hohen Keimzahl - d.h. einer Keimzahl, die den tatsächlichen Gegebenheiten näher kommt - hinderlich sind. Die höchsten Keimzahlen erreichten sie auf einem fleischextraktfreien Nährboden, dem sogenannten Albumosenagar. Er setzte sich folgendermaßen zusammen:

Aqua destillata	1000 ml
Agar-Agar	12,5 g
Albumose	7,5 g

Die oben genannten Autoren empfahlen diesen Nährboden wegen der bis zu 2ofach höheren Keimzahlen als den bis dahin geeignetesten für bakteriologische Wasseruntersuchungen. Ob und eventuell welche Folgerungen sie aus dieser Art der Wasseruntersuchung für die spezielle hygienische Fragestellung zogen, ist nicht bekannt.

PAKES (1901) verwandte zur Herstellung des Gelatinenährmediums Standortwasser, d.h. zur Herstellung des Mediums wurde das zu untersuchende Wasser benutzt. Er mußte aber feststellen, daß auch damit kein besseres

Kriterium für die Aussage über den tatsächlichen Keimgehalt im Wasser zu erhalten war als bei Verwendung von destilliertem Wasser.

Die Beobachtung einer Erhöhung der Zahl der Mikroorganismen in ruhig stehenden Trinkwässern (CRAMER, 1885, zit. nach BOLTON, 1886 und HERAEUS, 1886) warf die Frage auf, ob dieses Phänomen auf einer Auflösung von Bakterienklumpen oder auf einer echten Vermehrung beruhe. BOLTON (1886) bewies durch Überimpfungen, daß einige Bakterienarten die Fähigkeit der Vermehrung in Wasser haben, andere aber, z.B. Krankheitserreger von Tier und Mensch, nach einiger Zeit absterben. Obwohl man geneigt ist, Wasser für ein der Vermehrung von Bakterien ungünstiges Medium zu halten, gibt es doch Bakterien, die diesem Biotop angepaßt sind. BOLTON (1886) bezeichnete sie als eigentliche, autochthone Wasserbakterien. Diese Bakterien sollen selbst in destilliertem Wasser zur Vermehrung fähig sein, wie BOLTON angibt. Nach STEPHENSON (1939) liegt die für die Vermehrung von heterotrophen Bakterien nötige Menge an organischer Substanz zwischen 1o und 1oo mg/l. Nach ZOBELL und GRANT (1942) sind

Konzentrationen von unter o,1 mg/l organischer Substanz für eine wenn auch nicht beträchtliche Vermehrung von Wasserbakterien ausreichend. Obwohl diese Bakterien keine pathogenen Eigenschaften besitzen, sind sie für die qualitative Beschaffenheit eines Trinkwassers dennoch nicht ohne Bedeutung; denn es sind nach Genuß eines stärker keimhaltigen Wassers, das keine echten pathogenen Keime enthielt, bei Fehlen irgendwelcher Hinweise auf Verunreinigung Krankheiten beobachtet worden. (KRUSE, 1949, RODENWALDT u. BADER, 1951). Es waren meist nicht schwer verlaufende, als "Wasserkrankheit" bezeichnete Magen- und Darmstörungen, wobei über die Identität dieser Bakterien mit den oben genannten keine Klarheit besteht. Da die"Wasserbakterien" zwar bei Vermehrung einen Indikator für eine Verschlechterung des Wassers darstellen, für eine Infektionsgefahr aber keine sicheren Anhaltspunkte geben, gingen MIGULA (189o) und SCHARDINGER (1894) soweit, der Bestimmung der Keimzahl für hygienische Fragestellungen jede Aussagekraft abzusprechen, da diese Zahlen zu sehr von lokalen Verhältnissen beeinflußt sein könnten, die ganz außerhalb des Zusammenhanges mit der Frage nach

der Infektiosität stünden. MIGULA (189o) schlug daher vor, nicht die Zahl der Bakterien bzw. deren Kolonien zu bestimmen, sondern die Anzahl der in einer Wasserprobe enthaltenen Arten nach Kriterien wie Form, Farbe und Größe zu ermitteln. Nach seiner Meinung sollten in hygienisch einwandfreiem Wasser nicht mehr als zehn Arten vorkommen. SCHARDINGER (1894) empfahl die direkte Suche nach Coli-, Typhus-, Cholera- sowie Gärungs- und Fäulnisbakterien. Nur aus dem Vorliegen oder Nichtvorliegen dieser Bakterienarten glaubte er, Aussagen über die hygienische Trinkwasserbeschaffenheit machen zu können. Keine der beiden Methoden hat sich durchgesetzt, obwohl gerade die Grobtypisierung von MIGULA zu einer besseren Aussage über die Wasserbeschaffenheit führen könnte als die derzeit übliche Methode der Keimzählung.

Der Hygieniker sieht sich vor die undankbare Aufgabe gestellt, neben anderen Kriterien aus den Keimzahlen Rückschlüsse auf die Wasserqualität zu ziehen und Grenzwerte aufzustellen bzw. zu fordern. Nicht nur darüber, sondern auch über den Begriff der Keimzahl

und die Methodik seiner Gewinnung besteht keine völlige Übereinstimmung.

Als Synonyma werden angewandt:

1) Gesamtkeimzahl (HALLMANN, 1955, KRUSE, 1955, HEINRICH, H. u.a. 1966),
2) Gesamtkeimgehalt (MEYER-LANGBEIN-MÖHLE, 1949),
3) Keimzahl (GÄRTNER-REPLOH 1964, LIEBMANN, 1951),
4) "Keimzahl" (KRUSE, 1949),
5) "Gesamtkeimzahl" (BEGER, 1966).

Eine Definition, welche die Methodik der Keimzahlbestimmung beinhaltet, lautet zur Zeit folgendermaßen: Die Keimzahl = Gesamtkeimzahl = Keimgehalt gibt die Zahl der Bakterienkolonien an, die sich auf Nährgelatine bei Luftzutritt und einer Temperatur von 22°C binnen 48 Stunden so weit entwickeln, daß sie bei Betrachtung mit einer dreifach bis sechsfach vergrößernden Lupe oder gar mit bloßem Auge sichtbar werden. (BEGER 1966, BÜRGER 1938, GÄRTNER-REPLOH 1964, LIEBMANN 1951, MEYER-LANGBEIN-MÖHLE 1949; ebenso Entwurf DIN 2000, Stand Aug. 1967). Nach HALLMANN (1955) ist die Keimzahl das arithmetische Mittel aus den Zahlen, die auf Gelatinemedium bei 22°C und auf Fleisch-

extraktagar bei 37°C erhalten werden. Was die Dauer der Bebrütung anlangt, so fordert er mindestens 48h, besser jedoch fünf bis sieben Tage, bis sich keine neuen Kolonien mehr gebildet haben.

MÜLLER (1949) gibt zur Keimzahlbestimmung neben dem Ansatz mit Gelatinemedium auch je einen mit Fleischextraktagar bei 37°C und bei 22°C an. Der jeweils höchste Wert stellt die Keimzahl dar.

KRUSE (1959) empfiehlt, die Gesamtkeimzahl mit Agarnährboden bei 37°C und gleichzeitig in Agar- oder GelatinenÄhrboden bei 22°C zu bestimmen.

Im Jahre 1899 erhob das Kaiserliche Gesundheitsamt (zit. nach HÖLL, 1968) die Forderung, daß bei einem Oberflächenwasser, das durch Sandfiltration gereinigt ist und zur Trinkwasserverwendung bestimmt ist, im Filtrat nicht mehr als 100 Keime im ml enthalten sein sollen, die auf Nährgelatine bei 22°C Kolonien bilden. Die Zusammensetzung der Nährgelatine nach amtlicher Vorschrift des Reichsgesundheitsamtes war:

Fleischextrakt Liebig	5 g
Pepton	5 g
NaCl	2,5 g
Gelatine	1oo g
Wasser (dest. ?)	1ooo ml

Neutralisieren, dann alkalisieren mit 1,5 g Natriumcarbonat.

GROSS (193o) und KRUSE (1949) halten an obengenannter Forderung fest. Andere Autoren (SPITTA 1931, POPP 1965, HÖLL 1968) stehen dieser Grenzzahl mit Skepsis gegenüber und wollen ein Wasser mit einer Keimzahl von über 1oo - bestimmt mit der üblichen Gelatineplattenmethode - nicht ohne weiteres als unhygienisch bezeichnen. FLÜGGE (1915) stellte folgendes Schema für die Deutung der Keimzahlen auf Gelatineplatten auf:

1 - 2o Kolonien pro ml - sicher keine Infektionsgefahr,
2o- 2oo Kolonien pro ml - Infektionsgefahr nicht sicher ausgeschlossen,
2oo-5oo Kolonien pro ml - Infektionsgefahr besteht.

Eine Infektionsmöglichkeit kann heute als nicht vorhanden gelten, wenn das Wasser (mit einigen Ausnahmen bezüglich der Aufbewahrung) nicht höhere als zweistellige Keimzahlen enthält und außerdem in 1oo ml

E. Coli und coliforme Bakterien nicht nachzuweisen sind (Entwürfe zur DIN 2000). Die Aussage über den Gehalt an E.Coli ist von entscheidender Bedeutung. Wird in einem Wasser E. Coli gefunden, so läßt dies den Schluß zu, daß außerdem auch andere, eventuell pathogene Bakterien in das Wasser einzudringen vermögen. E.Coli dient also als Indikator für eine fäkale Verunreinigung, so daß aus dessen Auffindung in befriedigender Weise Schlüsse auf die Herkunft des Wassers und die Filtrationskraft der Bodenschichten gezogen werden können.

Die Auffindung von sogenannten coliformen Keimen läßt nach SELENKA (1967) mehr auf mangelnde Filtration als auf Eindringen von Abwasser schließen. Wiederum wird hier der bakteriologische Befund mit weiteren Aussagen gekoppelt.

Die Bakterienarten im Trinkwasser können aufgrund ihrer Herkunft sein:

1) autochthone "Wasserbakterien" oder solche Bakterien, die durch Zufuhr von zusätzlichen Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen eine beträchtliche Zunahme erfahren können,

2) eingeschwemmte "Erdbakterien" und

3) durch fäkale Verunreinigung oder mit sonstigen keimreichen Produkten ins Wasser gelangte Bakterien.

Nach RUBNER (19o7) und GOTSCHLICH (1926) soll die Eigenmikroflora des Wassers besonders stark an den Innenflächen von Pumpenrohren und Wasserleitungen, sowie an den Wandungen der Wasserbehälter und Auslaßhähne vertreten sein. Die anderen Bakterientypen gelangen durch Verunreinigung verschiedenster Ursachen ins Wasser.

Die verschiedenen Gruppen stellen verschiedene Ansprüche an die Kulturbedingungen. Wie oben gesagt, stellen die autochthonen Wasserbakterien nicht nur äußerst geringe Ansprüche an die gebotenen Nährstoffe, sondern können z.B. durch Fleischextrakt in ihrem Wachstum gehemmt werden.

Bakterien fäkaler Herkunft können sich dagegen besser auf nährstoffreichen, z.B. Fleischextrakt enthaltenden Nährböden gut vermehren, Auch benötigen sie zum Wachsen, wie von ihren natürlichen Lebensbedingungen

im Darm von Mensch und Tier leicht zu verstehen ist, höhere Temperaturen als viele "Erdbakterien" und autochthone Wasserbakterien.

Die bis zu zwanzigfach höheren Keimzahlen, die HESSE u. NIEDER (1898) auf ihrem fleischextraktlosen, mageren Nährboden gegenüber fleischextrakthaltigen Nährböden erzielt haben, beruhen vielleicht auf dem Umstand, daß Wässer zur Untersuchung kamen, die relativ viele der an den Biotop Wasser angepaßten Bakterien enthielten. Nach MÜLLER (1900) ist die Differenz der auf Nährböden mit und ohne Fleischextrakt erhaltenen Keimzahlen am größten bei über längere Zeit aufbewahrtem Leitungswasser, - hier hatten die autochthonen Wasserbakterien, die auf fleischextrakthaltigen Nährböden nicht erfaßt werden, Zeit, sich vor der Bebrütung zu vermehren - geringer bei fließendem Leitungswasser und Brunnenwasser, am geringsten jedoch bei stark verunreinigten Wässern, denen Kot und zersetzter Harn beigesetzt worden war, - wo also sehr viele fäkale Bakterien vorhanden waren, die bevorzugt auf fleischextrakthaltigen Nährböden wachsen. - Aus diesem Grunde ist möglicherweise der Albumosenagar auch nicht zur hygienischen Wasser-

untersuchung herangezogen worden.

Generell fragt sich nun, ob besondere ökologische Gruppen von Bakterien bei der Keimzahlbestimmung von Wässern erfaßt werden sollen, damit für den wasserhygienischen Bereich eine befriedigende Aussage gemacht werden kann, oder ob es sinnvoll ist, möglichst viele Mikroorganismen zu erfassen? Ist es sinnvoll, die Aussagen von Bakterien herzuleiten, die auf Fleischextraktagar bei 37°C wachsen? Kann man annehmen, daß die Zahl der auf Fleischektraktgelatine bei 22°C wachsenden Bakterien einen speziellen Aussagewert haben oder stellen sie nur ein wahllos herausgegriffenes Spektrum dar, zumal die Temperatur von maximal 22°C durch die Eigenschaft des Gelatinemediums vorgeschrieben wird?

Die Temperatur von 37°C für Fleischektraktagar ist in der Absicht gewählt worden, den Fäkalbakterien günstige Voraussetzungen für ihr Wachstum zu geben; jedoch läßt selbst eine hohe Keimzahl bei dieser Methodik nicht auf ausschließliche Anwesenheit von Fäkalbakterien schließen, da bei dieser Temperatur auch Arten nichtfäkaler Herkunft wachsen.

Außerdem wird der Nachweis für das Vorliegen einer fäkalen Verunreinigung durch die Ermittlung von E.Coli, Salmonellen o.ä. erbracht.

Die Möglichkeit, mit Hilfe der Gelatineplattenmethode eine, wenn auch geringe, Artendifferenzierung in gelatinasepositive und -negative Keime vorzunehmen, ist gleichzeitig auch ein Nachteil dieser Methode, da ein Wasser mit einer größeren Anzahl verflüssigender Keime die Probe unter Umständen schon nach 24 Stunden unauszählbar macht. Nach KRUSE (1949) und MÜLLER (1949) sollen die gelatineverflüssigenden Bakterien in den oberen Bodenschichten leben und ihr Vorhandensein in Trinkwässern daher immer auf Verunreinigung von oben bzw. auf einen mangelnden Filtrationseffekt der Bodenschichten hinweisen. TAYLOR (1958) mißt dem Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von gelatineverflüssigenden Keimen keinerlei Bedeutung zu. Auch im Entwurf zur DIN 2000 von 1967 taucht in der Bewertung der Keimzahlen eine Spezifikation in gelatinasepositive und -negative Keime nicht auf. Der Zusatz von Agar zum Gelatinemedium kann in subtropischen und tropischen Gebieten zwingende Notwendigkeit sein, wenn die mittleren Temperaturen nicht unter 25° C sinken. Wenn auch die Erfolge der bakteriologischen Untersuchungen von Wässern, die zu einer entscheidenden Reduzierung der durch Wasser übertragenen Seuchen beigetragen hat, die Methodik zu rechtfertigen scheint - sie wird seit 80 Jahren in fast unveränder-

ter Weise angewandt - muß überlegt werden, ob nicht mittels anderer Methoden weiterreichende Schlüsse gezogen werden könnten.

Die gestellte Frage gewinnt an Bedeutung, wenn man bedenkt, daß mit der Zunahme der Bevölkerungsdichte und der Industrialisierung und somit auch der Verunreinigung von Wässern Probleme für die Wasserversorgung auftreten, die vor 6o - 8o Jahren noch völlig oder weitgehend unbekannt waren. Speziell gedacht sei hier an die Grundwasseranreicherung, die Aufarbeitung von Wässern verschiedener Herkunft, den Stau von Flüssen mit einer Beeinträchtigung von ufernahen Wasserversorgungsanlagen, die unmittelbare Entnahme aus Oberflächenwasser und nicht zuletzt das Eindringen von Industrie- und Zivilisationsprodukten in Wasser und filtrierenden Boden. Bekanntlich wird für Aussagen über die Qualität eines Wassers nicht nur eine bakteriologische, sondern auch eine chemische Untersuchung gefordert und Wert auf das Ergebnis der Ortsbesichtigung gelegt. Es ist jedoch bekannt, daß selbst bei geringen chemischen Veränderungen in Wässern die Auswirkungen auf die Mikroflora beträchtlich sind (z.B. Massenansammlungen von Bakterien mit Schleimbildung auf Hochbehältern (SCHWEISFURTH u. BERG), und daß be-

sonders auch Substanzen in das Wasser gelangen können, die mit der "normalen" chemischen Wasseranalyse nicht erfaßt werden und sich auch durch Geruch und Geschmack nicht auffällig verhalten.

Da die bakteriologisch-hygienische Wasseruntersuchung ein Routineverfahren bleiben muß und somit von der Methodik her nicht kompliziert werden darf, fragte es sich, mit welchen Medien und Bebrütungstemperaturen der größte Aussagewert erzielt werden kann.

FRAGESTELLUNG

Von den oben beschriebenen Tatsachen und Unklarheiten ausgehend, hielten wir es für nützlich, die Problematik der Keimzahluntersuchung in Wässern erneut aufzugreifen. Es ging uns darum, unter verschiedenen Kulturbedingungen diejenigen herauszufinden, die einer grösseren Zahl von Keimen eine Koloniebildung erlaubt, als dies bei den üblicherweise angewandten Methoden der Fall ist.

Wird eine Wasserprobe mit verschiedenen Kulturmedien auf ihre Keimzahl hin untersucht, so gibt es als Begründung für den Erhalt verschiedener Koloniezahlen folgende Möglichkeiten.

Niedere Keimzahlen auf einer Platte mit einem bestimmten Kulturmedium sind denkbar durch das alleinige Erfassen einer zahlenmäßig gering vertretenen Keimart oder durch teilweises Erfassen mehrerer Keimarten.

Höhere oder die höchsten Keimzahlen lassen sich dadurch erklären, daß entweder das Medium einer Keimart, die auf den anderen Nährböden nicht oder nur kaum

wachsen kann und die zahlenmäßig am stärksten vertreten ist, optimale Wachstumsbedingungen gibt oder, daß die Platte mit der höchsten Koloniezahl in geringerem Maße einen selektionierenden Einfluß ausübt als das obige Medium und mehrere, wenn auch nicht alle, Keimarten erfaßt.

Schließlich könnte die höchste Keimzahl auch dadurch zustande kommen, daß die Vertreter aller Keimarten Kolonien bilden. Wir gingen daher folgenden Fragen nach:

Wie verhalten sich die Keimzahlen von Wasserproben bei

a) gleichem Nährmedium und verschiedenen Temperaturen,

b) verschiedenen Nährmedien und gleicher Temperatur?

Welche Zusatzstoffe haben eine keimzahlerhöhende Wirkung?

Wie wirkt sich das Fortlassen bestimmter Stoffe aus?

METHODIK

Die untersuchten Wasserproben stammten entweder aus Quellen im saarländischen und rheinland-pfälzischen Buntsandstein oder aus 5o - 1oo m tiefen Brunnen des gleichen Gebietes, wovon einige mehrfach untersucht wurden.

Die Entnahme der Proben erfolgte in sterilen Glasgefäßen, der Transport unter Vermeidung einer Erwärmung und die Untersuchung in unmittelbarem Anschluß daran. Die Proben wurden vor der Aufarbeitung 1oo mal geschüttelt. Die verflüssigten Nährmedien lagen im Augenblick der Mischung mit dem zu untersuchenden Wasser unter 42°C. Die Auszählung der Kolonien wurde nach der jeweils angegebenen Bebrütungszeit mit einer fünffach vergrößernden Lupe vorgenommen. Von jeder Wasserprobe, jedem Nährmedium und jeder der angewandten Bebrütungstemperaturen wurden mindestens 5 und meistens 8 Petrischalen parallel angesetzt.

Die Nährböden hatten folgende Zusammensetzung:

a) Fleischextraktpepton (FE-Agar)

(Agarnährböden der Deutschen Einheitsverfahren, 1960):

Fleischextrakt (Marke "PRÄRIE")	3 g
Pepton (Oxoid L 37)	5 g
Agar-Agar (Oxoid Nr. 3)	15 g
Aqua dest.	1000 ml

pH 7,2 - 7,4

b) Gelatinenährböden "Oxoid"

(Standard Methods for the examination of water and sewage, 1946):

Lab- Lemco Beef Extract	3 g
Pepton (Oxoid L 37)	5 g
Gelatine (Oxoid L 8)	120 g
Aqua dest.	1000 ml

pH 6,8

c) Standard - Plate - Count-Medium (= SPC-Agar)

(aus Standard Methods for the examination of water and waste water, 1965):

Peptone-Tryptone (Oxoid L 42)	5 g
Yeast-Extract (Oxoid L 20)	2,5 g

Glucose	1	g
Agar-Agar (Oxoid Nr. 3)	15	g
Aqua dest.	1ooo	ml

End-pH 7,o ± o,1

d) P - Agar (WOLTERS und SCHWARTZ, 1956):

Pepton (Oxoid L 37)	1	g
K_2HPO_4	o,1	g
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	Spur	
Agar-Agar (Oxoid Nr.3)	1o	g
Leitungswasser	1ooo	ml +)

pH mit K_2CO_3 auf 7,2 einstellen.

e) P - Agar mit verschiedenen Zusätzen, (vergl. Seite 37)

+) Die Autoren WOLTERS und SCHWARTZ verwendeten Standortwasser, wir das Wasser des Institutes, da sich die generelle Verwendung von Standortwasser für Routineuntersuchungen verbietet.

Unterschiede zwischen den arithmetischen Mittelwerten wurden anhand der Sicherheitspunkte nach STUDENT auf ihre Signifikanz geprüft. Dabei kamen folgende Formeln zur Anwendung (CAVALLI-SFORZA, 1964):

$$t = \frac{m_A - m_B}{s} \sqrt{\frac{n_A \cdot n_B}{n_A + n_B}}$$

$$s = \sqrt{\frac{S(x_A - m_A)^2 + S(x_B - m_B)^2}{n_A + n_B - 2}}$$

Die Symbole haben folgende Bedeutung:

t = Signifikanzschwelle,

m_A, m_B = arithmetische Mittelwerte einer Zahlenreihe,

n_A, n_B = Anzahl der zu einer Zahlenreihe gehörenden Werte,

s = Streuung,

x_A, x_B = Meßwerte.

Die Sicherheitspunkte nach STUDENT haben eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von 5 %.

EXPERIMENTELLER TEIL

Zur Frage des Temperaturoptimums für P-Agar haben WOLTERS u. SCHWARTZ (1951) vergleichende Untersuchungen bei 37°C, 22°C und 1o°C angestellt. Sie erhielten bei 22°C die höchsten Keimzahlen. Wir machten ebenfalls vergleichende Untersuchungen für P-Agar bei Temperaturen von 22°C, 27°C und 37°C (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Vergleich der Keimzahlen auf P-Agar bei Bebrütungstemperaturen von 22°C, 27°C und 37°C und einer Bebrütungsdauer von 48 Stunden.

Probe	Keimzahlen / ml		
	22°C	27°C	37°C
1	8	39	3
2	7	27	4
3	6	42	12
4	2o	65	9
5	15	38	11
6	78	1o9	27

Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte der Keimzahlen von jeweils 6 parallel angesetzten Platten.

Es ergaben sich für P-Agar bei einer Bebrütungstemperatur von 27°C regelmäßig höhere Keimzahlen als bei 22°C und bei 37°C. Bei allen weiteren Untersuchungen wurde daher die Temperatur von 27°C für P-Agar beibehalten.

Um die Eigenschaften des FE-Agar mit denen des P-Agar vergleichen zu können, mußte der Temperaturfaktor eliminiert werden. FE-Agar wurde daher neben der in der hygienischen Praxis allgemein angewandten Temperatur von 37°C auch bei 27°C bebrütet. Auch der SPC-Agar (Standard-Plate-Count-Agar) wurde bei 27°C bebrütet, bei einigen Ansätzen daneben auch bei 37°C. Die Temperatur des Gelatinenährbodens konnte wegen ihrer besonderen Eigenschaft, bei Temperaturen über 22°C zu verflüssigen, nicht variiert werden.

Nach diesem Schema wurden von 16 Wasserproben nach 2 und nach 6 Tagen die Keimzahlen bestimmt, welche auf Tabelle 2a und 2b wiedergegeben sind.
Die Proben Nr. 1 bis 3 sowie 12 bis 16 stammen aus Tiefbrunnen, die Proben Nr. 4 bis 7 aus einer ungefaßten Quelle, die Proben 8 bis 11 aus gefaßten Quellen.

Tabelle 2a: Keimzahlen / ml Wasser nach 2 Tagen Bebrütungsdauer auf FE-Agar bei 37°C, Gelatinemedium bei 22°C, FE-Agar bei 27°C, P-Agar bei 27°C, SPC-Agar bei 27°C und SPC-Agar bei 37°C.

Probe	FE-Ag. 37°C	Gel. 22°C	FE-Ag. 27°C	P-Ag. 27°C	SPC-Ag. 27°C	SPC-Ag. 37°C
1	4	7	6	6	16	6
2	5	o	1	2	3	-
3	o	o	o	1	2	-
4	8	173	141	144	19o	12
5	3	48	25	29	134	5
6	7	1oo	73	91	116	13
7	13	99	1o5	1o9	159	-
8	2o	8o	75	115	13o	-
9	1o	v.	16	15	25	-
1o	2	7	9	31	32	5
11	1	3	3	3	4	-
12	6	5	17	28	56	26
13	o	o	o	o	3	-
14	16	o	19	1o8	95	-
15	o	o	o	o	3	-
16	6	o	8	4	4	4

Tabelle 2b: Keimzahlen / ml Wasser nach 6 Tagen Bebrütungsdauer auf FE-Agar bei 37°C, Gelatinemedium bei 22°C, FE-Agar bei 27°C, P-Agar bei 27°C, SPC-Agar bei 27°C und SPC-Agar bei 37°C.

Probe	FE-Ag. 37°C	Gel. 22°C	Fe-Ag. 27°C	P-Ag. 27°C	SPC-Ag. 27°C	SPC-Ag. 37°C
1	4	v.	58	88	1o1	8
2	11	11	7	13	2o	-
3	1	16	6	18	19	-
4	18	v.	156	193	23o	19
5	4	v.	31	5o	149	6
6	13	v.	84	113	139	18
7	16	v.	113	158	18o	-
8	37	v.	12o	43o	15o	-
9	17	v.	44	7o	6o	-
1o	4	v.	18	35	43	9
11	2	v.	5	1o	1o	-
12	8	v.	75	19o	16o	55
13	1	24	4	5	12	-
14	3o	68o	13o	49o	68o	-
15	o	o	o	9	2o	-
16	17	29	25	4o	25	8

Anmerkung zu Tab. 2a und 2b:

v.: Gelatineplatten verflüssigt und somit unauszählbar,

- : Proben nicht angesetzt,

Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte der Keimzahlen von jeweils 6 parallel angesetzten Platten.

Wie aus Tabelle 2a und 2 b ersichtlich ist, lagen die Keimzahlen von FE-Agar bei einer Temperatur von 27°C mit einer Ausnahme immer über denen von 37°C. Entsprechendes gilt auch für SPC-Agar, der ebenfalls bei 27°C regelmäßig höhere Keimzahlen erbrachte als bei 37°C.

Von den 16 Untersuchungen waren bei Vergleich von FE-Agar und P-Agar, beide bei 27°C bebrütet, nach zwei Tagen die Keimzahlen auf P-Agar 6mal nicht signifikant unter oder gleich den Werten von FE-Agar, 10mal über diesen Werten, davon 5mal mit Signifikanz. Nach sechs Tagen lagen die Werte von P-Agar immer über denen von FE-Agar, von den 16 Untersuchungen 11mal mit Signifikanz. Dies besagt, daß die Verwendung von P-Agar bei 27°C und unter Berücksichtigung der von uns untersuchten Wässer gegenüber FE-Agar, der bei gleicher Temperatur bebrütet wird, erst nach 6 Tagen einen deutlichen Fortschritt gegenüber FE-Agar bedeutet. Da für die Routine eine 6tägige Bebrütung im allgemeinen nicht praktikabel sein dürfte, erbringt der P-Agar keinen eindeutigen Vorteil gegenüber FE-Agar.

Bei einem Vergleich von P-Agar mit SPC-Agar bei 27°C

lagen nach zwei Tagen die Keimzahlen von SPC-Agar 1mal unter, 15mal über den Werten von P-Agar, davon 7mal mit Signifikanz. Nach 6 Tagen waren die Werte von SPC-Agar 5mal unter oder gleich denen von P-Agar, 11mal über ihnen, davon 6mal mit Signifikanz. Wiederum unter dem Vorbehalt der Art der von uns untersuchten Wässer liefert also der SPC-Agar sowohl nach 2 als auch nach 6 Tagen höhere Werte als der P-Agar, wobei die keimzahlerhöhende Wirkung des SPC-Agar schon nach 2 Tagen deutlich zum Ausdruck kommt.

Entsprechend lagen bei einem Vergleich von SPC-Agar bei 27°C mit FE-Agar bei 27°C nach zwei Tagen die Keimzahlen von SPC-Agar 1mal unter, 15mal über denen von FE-Agar, davon 10mal mit Signifikanz. Nach sechs Tagen waren die Werte 1mal gleich, 15mal lagen die von SPC-Agar über denen von FE-Agar, davon 13mal mit Signifikanz.

Die Werte auf FE-Gelatine bei 22°C lagen immer unter denen von SPC-Agar bei 27°C und teils über, teils unter den Werten von P-Agar und FE-Agar bei jeweils 27°C.

Eine Quelle, die in dem Gebiet von Homburg/Saar aus anstehendem Buntsandstein entspringt, wurde über einen Verlauf von 6 Wochen viermal mit oben angegebenen Kulturbedingungen auf ihren Keimgehalt hin geprüft (Tab. 2, Nr. 4 - 7). Die erhaltenen Keimzahlen nach 2 und nach 6 Tagen sind in Abb. 2a und 2 b wiedergegeben.

Aus den Abbildungen 1a und 1b wird deutlich, daß bei verschiedenen Nährmedien und Temperaturen die Veränderungen, die ein Wasser in Bezug auf den Keimgehalt erfährt, sich in ganz unterschiedlichem Maße in der "Keimzahl" ausdrücken. Den größten Einfluß übt die Bebrütungstemperatur aus, denn FE- und SPC-Agar bei 37°C einerseits und FE-, P- und SPC-Agar bei 27°C andererseits zeigen bei dieser Untersuchung untereinander ein ähnliches Verhalten gegenüber den Keimgehaltsschwankungen. Die alleinige Betrachtung der bei 37°C erhaltenen Keimzahlen könnte zu der Annahme verleiten, daß das Wasser in seinem Keimgehalt keinen großen Schwankungen unterworfen war. Daß dem nicht so ist, wird erst durch die Keimzahlen, die bei niederen Temperaturen erhalten wurden, erkennbar.

Die Änderung der Bakterienflora des Wassers dürfte in vorliegendem Falle witterungsbedingt sein, denn am 19.2.1967 schlug Dauerfrost in Tauwetter mit Regen um.

In welch unterschiedlichem Maße sich eine tatsächliche Änderung der Bakterienzahl in den "Keimzahlen" auf verschiedenen Nährböden manifestiert, wird auch aus Tabelle 3 deutlich. Es wurden unter verschiedenen Kulturbedingungen die Keimzahlen von Tiefbrunnenwasser bestimmt, nachdem das Wasser verschieden lange abgepumpt worden war.

Tabelle 3: Keimzahlen nach 48 Stunden, bestimmt nach verschieden langem Abpumpen unter verschiedenen Kulturbedingungen.

Medium	Keimzahl nach		
	3o min.	2 Std.	3 Std.
FE-Agar, 37°C	1	o	o
FE-Gel., 22°C	5	o	3
SPC-Agar, 27°C	117	18	17
P-Agar, 27°C	119	25	11

Abbildung 1a: Keimzahlen eines Quellwassers (Proben Nr. 4 bis 7, Tabelle 2a) über einen Zeitraum von 6 Wochen, bestimmt unter verschiedenen Kulturbedingungen nach 2 Tagen Bebrütungsdauer.

Abbildung 1b: Keimzahlen eines Quellwassers (Proben Nr. 4 bis 7, Tabelle 2b) über einen Zeitraum von 6 Wochen, bestimmt unter verschiedenen Kulturbedingungen nach 6 Tagen Bebrütungsdauer.

Anmerkung: Die Wasserproben der Abb. 1a und 1b sind identisch. Die zwischen den Meßpunkten ausgezogenen Linien dienen der Darstellung und erheben keinen Anspruch auf die Höhe der Keimzahlen im Zeitraum zwischen den einzeln durchgeführten Untersuchungen.

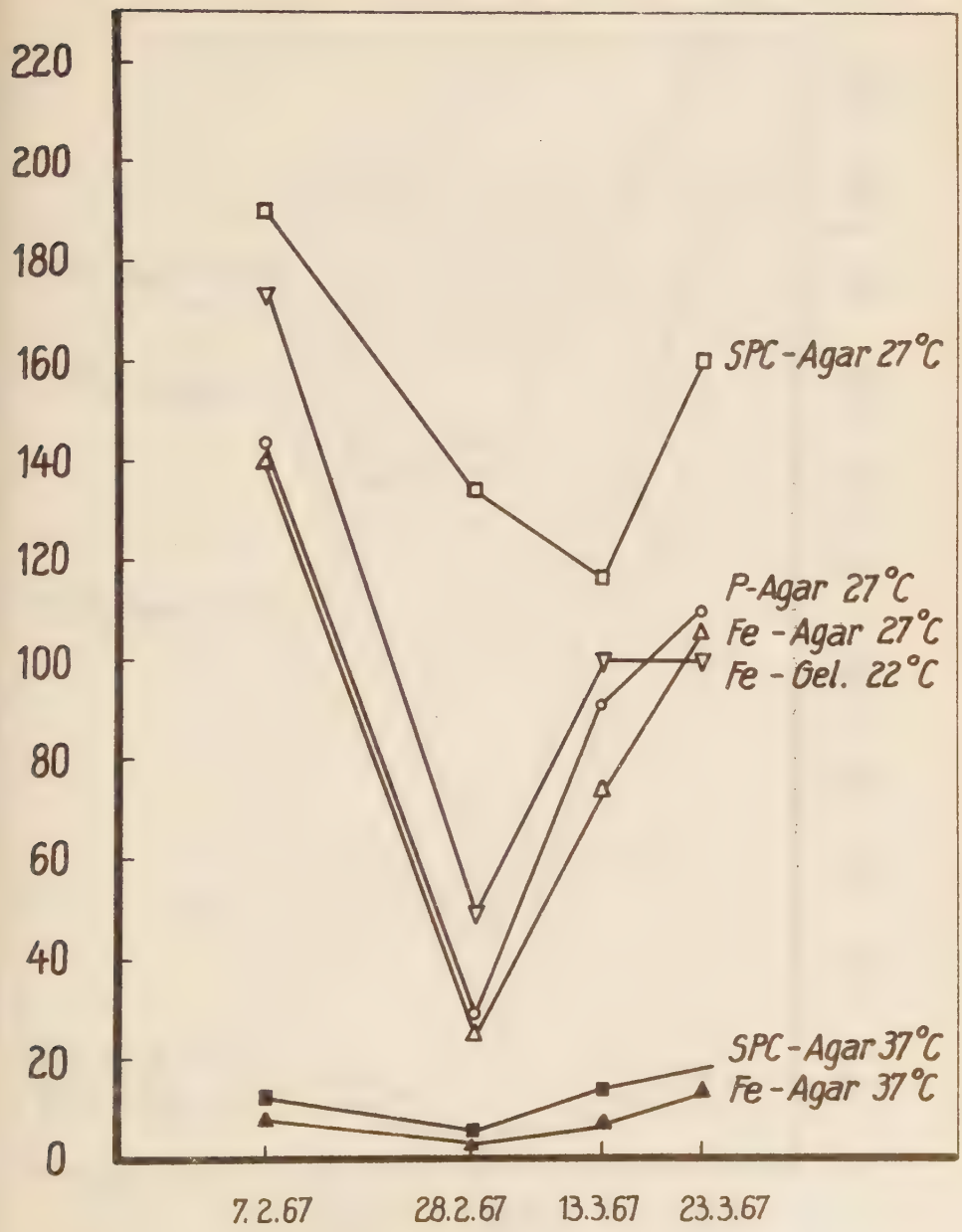
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
SPC-Agar 27°C
P-Agar 27°C
Fe-Agar 27°C
Fe-Gel. 22°C
SPC-Agar 37°C
Fe-Agar 37°C
7.2.67
28.2.67
13.3.67
23.3.67

Abb. 1a

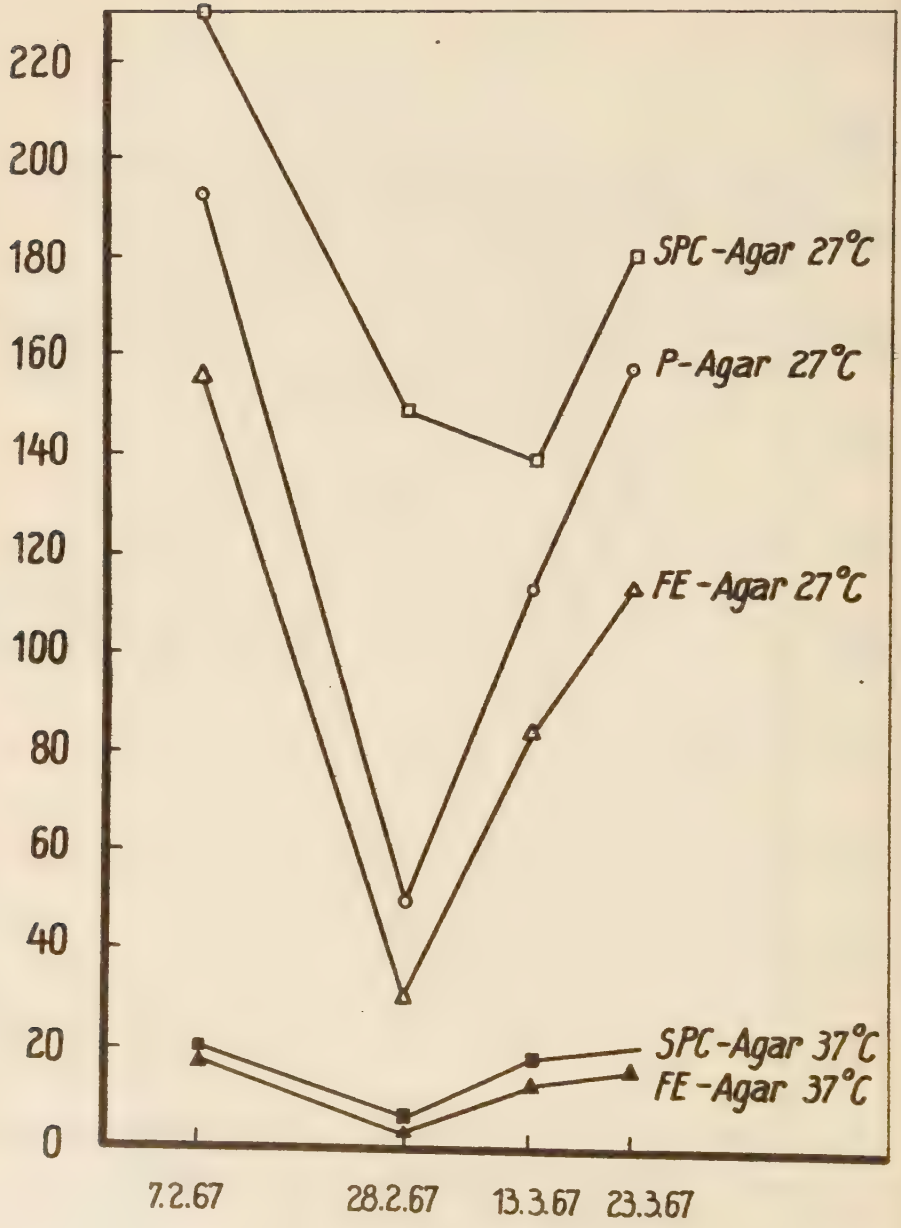
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
SPC-Agar 27°C
P-Agar 27°C
FE-Agar 27°C
SPC-Agar 37°C
FE-Agar 37°C
7.2.67
28.2.67
13.3.67
23.3.67

Abb. 1b

Auf der Suche nach Zusatzstoffen, welche die Keimzahl erhöhen könnten, setzten wir dem P-Agar verschiedene Substanzen zu und verglichen die mit diesen Nährböden erhaltenen Keimzahlen mit denen von einfachem P-Agar. Die Medien hatten folgende Zusammensetzung:

P-Agar + Glukose (1g/l)

P-Agar + Hefeextrakt (1g/l)

P-Agar ohne Pepton + Aminosäurengemisch (1g/l)
Casaminoacids, Difco, vitaminfrei)
= P-As-Agar

P-Agar + Salze organischer Säuren (Na-Citrat,
Na-Acetat u.
Ca-Laktat
je 500 mg/l).

Die mit diesen Medien erhaltenen Keimzahlen sind in den Tabellen 4 bis 7 wiedergegeben.

Tabelle 4: Vergleich der Keimzahlen / ml nach 2 und nach 6 Tagen Bebrütungsdauer bei 27°C auf P-Agar und P-Agar + Glukose (1g/l).

Probe	Keimzahlen auf			
	P-Agar		P-Agar + Glukose	
	nach		nach	
	2^d	6^d	2^d	6^d
I	2	12	2	18
2	115	43o	1oo	44o
3	28	5o	26	4o
4	91	113	56	79

Anmerkung: Die angegebenen Zahlen bei dieser und den folgenden Tabellen 4 bis 7 sind Mittelwerte aus je 8 Bestimmungen pro Medium und Wasserprobe.

Tabelle 5: Vergleich der Keimzahlen / ml nach 2 und nach 6 Tagen Bebrütungsdauer bei 27°C auf P-Agar und P-As-Agar (P-Agar, dabei Aminosäurengemisch 1g/l anstatt Pepton).

Probe	Keimzahlen auf			
	P-Agar nach		P-As-Agar nach	
	2^d	6^d	2^d	6^d
1	115	430	75	300
2	28	50	18	38
3	91	113	71	150
4	0	9	0	4

Tabelle 6: Vergleich der Keimzahlen / ml nach 2 und nach 6 Tagen Bebrütungsdauer bei 27°C auf P-Agar und P-Agar + organische Säuren.

Probe	Keimzahlen auf			
	P-Agar		P-Agar + organ.Säuren	
	nach		nach	
	2^d	6^d	2^d	6^d
1	1	17	o	16
2	o	9	o	16
3	o	1o	2	11
4	1	19	o	14
5	15	28	11	25
6	85	98	65	92

Tabelle 7: Vergleich der Keimzahlen / ml nach 2 und nach 6 Tagen Bebrütungsdauer bei 27°C auf P-Agar und P-Agar + Hefeextrakt.

Probe	Keimzahlen auf P-Agar nach 2d	6d	P-Agar + Hefeextrakt nach 2d	6d
1	2	13	7	97
2	91	113	127	14c
3	28	5c	74	114

Der Zusatz von Glukose und von Salzen organischer Säuren zu P-Agar sowie der Ersatz des Pepton durch ein Aminosäuregemisch hatten bei den von uns untersuchten Wässern keinen eindeutig keimzahlerhöhenden Effekt. Lediglich P-Agar + Hefeextrakt brachte gegenüber P-Agar höhere Keimzahlen.

Es ist generell die Vermutung nicht auszuschließen, daß zwischen dem Gehalt eines Wassers an organischer Substanz

und der Keimzahl eine Relation besteht. Einschränkend muß jedoch gesagt werden, daß der $KMnO_4$-Verbrauch weder eine Absolutmethode zur Bestimmung organischer Substanz in Wasser ist, noch etwas über die Abbaubarkeit der so gefundenen organischen Substanz aussagt.

Bei 1o verschiedenen Trinkwasserproben wurde neben der Keimzahl auf P-Agar bei 27°C nach 6 Tagen Bebrütungsdauer auch jeweils der $KMnO_4$-Verbrauch in mg/l bestimmt. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 8 wiedergegeben.

Tabelle 8: Vergleich der Keimzahlen / ml verschiedener Wässer, bestimmt auf P-Agar bei 27°C nach 6 Tagen Bebrütungsdauer mit dem $KMnO_4$- Verbrauch in mg/l.

Probe	$KMnO_4$-Verbr. in mg/l	Keimzahlen nach 6d
1	7,9	14o
2	8,2	11o
3	8,2	13o
4	8,8	25
5	9,1	112
6	9,8	98
7	9,8	29
8	1o,7	145
9	11,7	38

Die Keimzahlen, bestimmt auf P-Agar bei 27°C, lassen keine Parallelität mit dem $KMnO_4$-Verbrauch erkennen. Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, ob andere Bestimmungsmethoden für abbaubare organische Substanz eine Relation zu den Keimzahlen erbringen.

Das häufig angewandte Gelatinemedium birgt neben gewissen Schwierigkeiten bei der Herstellung die Gefahr in sich, daß die Ablesung der Keimzahlen durch Verflüssigung eines Teiles oder der ganzen Platte erschwert bzw. unmöglich gemacht werden kann. Der Nachweis der Gelatinehydrolyse, worauf die Verflüssigung beruht, läßt sich ohne diese Schwierigkeiten rationell und auch nach Bebrütung bei Temperaturen über 22°C durchführen, wenn man einem beliebigen Agarmedium o,5 - 1 % reine Gelatine zusetzt. Nach der Bebrütung werden alle Kolonien ausgezählt und danach das Medium mit Quecksilberchloridlösung überschichtet. Nach 2 bis 4 min. hat sich das Medium durch eine Fällungsreaktion weiß getrübt und gelatinespaltende Kolonien lassen sich an ihrem durchsichtigen Hof erkennen und auszählen.

Auch hier kann es je nach der Zahl gelatinepositiver Keime zu einem Ausbleiben der Fällungsreaktion auf der

ganzen Platte kommen. Immerhin konnte doch aber eine allgemeine Keimzahl bestimmt werden.

Zur Herstellung des Reagenzes werden 15 g $HgCl_2$ in 1oo ml destilliertem Wasser und 2o ml konz. HCL gelöst. Eine gesättigte Ammoniumsulfatlösung soll auch verwendet werden können. (Manual of Microbiological Methods, 1957). Einige mit dieser Methode durchgeführten Bestimmungen sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 9: Bestimmung der Keimzahlen / ml auf P-Agar bei 27°C, P-Agar + Gelatine bei 27°C und FE-Gelatine bei 22°C nach 48 Stunden Bebrütungsdauer und der Anzahl gelatinespaltender Kolonien (letztere jeweils hinter dem Schrägstrich):

Probe	Keimzahlen auf		
	P-Agar	P-Agar + Gelatine	FE-Gelatine
1	27	24/14	17/13
2	38	27/15	16/ 3
3	42	26/18	21/ 3
4	66	54/28	35/ 6
5	95	7o/5o	5o/ 3
6	38	3o/21	3o/ 3
7	6	9/5	6/ 2
8	1o9	115/7o	99/15

Wie aus den Werten der Tabelle 9 hervorgeht, sind die Anteile der gelatinehydrolysierenden Keime bei der auf P-Agar + Gelatine mit der Reagenzmethode ermittelten Keimzahlen erheblich höher als auf dem Gelatinemedium, wo die Verflüssigungshöfe ausgezählt wurden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß bei einem geringen Hydrolysierungsgrad die Fällungsreaktion mit $HgCl_2$ schon negativ wird, eine sichtbare Verflüssigung aber noch nicht eingesetzt hat, oder daß auf dem nährstoffärmeren Medium (in vorliegendem Falle P-Agar) generell eine höhere Anzahl gelatinasepositiver Keime zu sichtbaren Kolonien heranwächst. Die höher liegende Bebrütungstemperatur mag ebenfalls eine Rolle gespielt haben.

DISKUSSION

Die Begriffe Keimzahl und Gesamtkeimzahl können für den unvoreingenommenen Betrachter irreführend sein, scheinen sie doch dem Worte nach einen für ein Wasser absoluten Wert anzugeben. Für eben diesen Betrachter wird die kulturell ermittelte Keimzahl zum tatsächlichen Keimgehalt eines Wassers. Das Wort "Koloniezahl" erscheint uns daher angemessener, da hierin die Bestimmungsmethodik wenigstens im Prinzip zum Ausdruck kommt, obwohl die Bezeichnung nicht ganz korrekt ist, da primär eine Aussage über die Zahl der Bakterien gemacht werden soll und die Kolonien uns dazu nur ein Mittel sind. BURMAN (1963) empfiehlt ebenfalls den Begriff "colonie counts" und wendet sich gegen die Bezeichnung "total bacterial counts".

HESSE (1897), der anstelle von FE-Pepton-Gelatine als erster die Verwendung von FE-Pepton-Agar zur bakteriologischen Wasseruntersuchung vorschlug, stellte fest, daß bei Brutschranktemperatur von 37°C ein großer Teil der im Wasser enthaltenen Bakterien nicht zu Kolonien auswächst. Dies ist - zumindest zum Teil - durch die temperaturbedingte Selektion zu erklären. Die von uns angewandte Bebrütungstemperatur von 27°C scheint den

selektionierenden Einfluß, wenn nicht auszuschalten, so doch zumindest einzuschränken, da die Bebrütung bei 27°C nicht nur höhere Keimzahlen als bei 37°C, sondern auch konstant höhere als bei 22°C ergab.

Neben dem Temperaturfaktor hat die Zusammensetzung der Nährböden Einfluß auf die Höhe der erhaltenen Keimzahlen, wobei zu beachten ist, daß trotz quantitativer Gleichheit der Inhaltsstoffe der Nährböden Differenzen in der qualitativen Beschaffenheit bestehen können. Gedacht sei hier neben den verschiedenen Güteklassen von Gelatine, Fleischextrakt und Pepton z.B. an den verschiedenen Gehalt an Spurenelementen, die einen teils fördernden, teils aber auch hemmenden Einfluß auf das Bakterienwachstum haben.

Nach HESSE (1897) sollen bei einer Temperatur von 22°C die Keimzahlen von FE-Agar immer über denen von FE-Gelatine liegen. GOTSCHLICH (1926) erhielt entgegengesetzte Ergebnisse. Aus unseren Ergebnissen läßt sich darüber trotz Signifikanzberechnungen keine Aussage machen. Es ist erst recht unmöglich, wenn zum Vergleich verschiedener Keimzahlen nur Einzeluntersuchungen heran-

gezogen werden, wie dies in Routineuntersuchungen unumgänglich ist. Diese ergeben wegen der großen Streuung, die bei Paralleluntersuchungen deutlich wird, keine vertretbare Beurteilungsgrundlage (OBERZILL, 1957).

Die verschiedenen Nährböden weisen in Bezug auf Eiweißmenge und den Gehalt an verschiedenen Zusatzstoffen erhebliche Unterschiede auf. Der Gedanke liegt nahe, daß wie die Temperatur auch die jeweilige Zusammensetzung der Nährböden einen selektiven Einfluß ausübt. Es ist nicht Sinn der Keimzahlbestimmung, nur einige der im Wasser vorhandenen Bakterienarten zu erfassen, sondern nach Möglichkeit das gesamte Keimspektrum eines Wassers auf der Platte wiedererscheinen zu lassen. BURMAN (1963) beschreibt die Eigenschaft des hierfür erforderlichen Mediums mit "Nutrient non inhibitory agar culture medium".

Um dieser Forderung gerecht zu werden, müßte eine Selektion durch die Art der Kultivierung im Idealfalle vollkommen ausgeschaltet, in praxi zumindest in möglichst geringem Rahmen gehalten werden. Eine höhere Keim- bzw. Koloniezahl kann - wie oben ausgeführt - auf stattgefundener Selektion einer in der Überzahl vor-

handenen Keimart oder aber auf allgemeiner Verringerung des selektionierenden Einflusses beruhen. Ersteres ist wohl bei P-Agar der Fall, der dem Albumosen-Agar nach HESSE u. NIEDER (1898) stark ähnelt. Von letzterem ist bekannt, daß er speziell den "Wasserbakterien" zur Koloniebildung verhilft (Müller, 1900); die Keimzahlen sind hier meist höher als auf PE-Agar bei gleicher Temperatur (s. Tabelle 2, ebenso bei SCHWARTZ, 1954). Die Kolonien sind klein und in ihrem Aussehen relativ einförmig.

Daß die oben beschriebenen höheren Keimzahlen auf SPC-Agar (Standard - Plate - Count - Medium) im Vergleich zu den anderen untersuchten Nährböden tatsächlich auf einer Verminderung des Selektionseinflusses beruhen, ist dadurch erwiesen, daß die Zahl der Keimarten, approximativ bestimmt nach Kriterien wie Form, Farbe und Aussehen der Kolonien, auf diesem Nährboden immer größer oder zumindest gleich den Zahlen auf den anderen Medien war. BUCKSTEEG (1926) ging der Frage nach, ob und inwieweit eine Korrelation zwischen verschiedenen chemischen Wasseranalysen und der Keimzahl (Art des Mediums und der Bebrütungstemperatur sind nicht angegeben) besteht. Er konnte mit dem $KMnO_4$ - Verbrauch keine, mit

anderen Daten der chemischen Wasseranalyse nur schwerlich eine Parallelität feststellen. Auch uns gelang es unter Verwendung des P-Agar nicht, einen Zusammenhang der so erhaltenen Keimzahlen mit dem $KMnO_4$-Verbrauch zu finden (s. Tabelle 7). BUCKSTEEG begründete dies mit der Ungenauigkeit der Keimzahlbestimmung im Plattengußverfahren und der Tatsache, daß man damit nur einen Bruchteil der im Wasser befindlichen Keime erfasse. Wäre dieser Bruchteil immer konstant, dürfte dies einer Parallelität, wo es ohnehin nur auf den relativen Wert ankommt, nicht im Wege stehen.

Eine andere Frage ist, ob die Erwartung einer Parallelität zwischen chemischen und bakteriologischen Untersuchungen grundsätzlich gerechtfertigt ist. Wasser passiert bei der Bildung von Grundwasser normalerweise eine oberflächliche Humusschicht mit starker Bakterientätigkeit, wo es physikalisch und biologisch verändert und somit von verschiedenen Inhaltsstoffen befreit wird. Gleichzeitig nimmt es im Boden befindliche organische und anorganische Substanzen auf. Anschließend wird es in den tieferen Bodenschichten zusätzlich filtriert und je nach

Beschaffenheit des Bodens mehr oder weniger von Bakterien befreit. So erfährt nach OBERZILL (1957) ein Quellwasser aus klüftigem Gestein, das von einer ausreichenden Humusschicht bedeckt ist, zwar eine chemische Aufarbeitung, ohne daß die mitgeschwemmten Keime von dem schlecht filtrierenden Untergrund zurückgehalten werden. Es können sich also bei chemisch einwandfreier Beschaffenheit des Wassers doch hohe Keimzahlen ergeben. Bei guter Filtrationskraft des Untergrundes und dünner Humusschicht kann ein chemisch unverändertes, aber keinarmes Wasser die Folge sein.

MALLMANN u. BREED (1941) führten vergleichende Keimzahluntersuchungen auf einem Agarnährboden mit und ohne Glucosezusatz (1g/l) aus. Sie bebrüteten 24 h bei 37°C und stellten fest, daß der Agarnährboden mit Glucose höhere, die Signifikanzschwelle allerdings nicht erreichende Keimzahlen ergibt.

WOLTERS u. SCHWARTZ (1956) fanden ebenfalls durch Glucosezusatz (1g/l) zum P-Agar, der bei 22°C bebrütet wurde, nach 2 Tagen höhere Keimzahlen als auf P-Agar ohne Zusatz. Der keimzahlerhöhende Effekt der Glucose war nach 6 Tagen nicht mehr vorhanden. Sie erklärten diesen Effekt durch

eine beschleunigende Wirkung der Glukose auf die Koloniebildung, die allerdings nur in den ersten Tagen deutlich wird, da die später auftretenden sauren Stoffwechselprodukte das Bakterienwachstum hemmen.

Die genannten Ergebnisse konnten von uns nicht reproduziert werden (s. Tabelle 4).

Von der Vorstellung ausgehend, daß das in allen Nährböden enthaltene Pepton von manchen Bakterien nicht oder nur schlecht verwendet werden könnte, änderten wir den P-Agar dahingehend, daß er statt Pepton die gleiche Menge eines Aminosäuregemisches enthielt. Wie Tabelle 5 zeigt, hat sich diese Hypothese nicht bestätigt.

Der Zusatz von einigen Salzen organischer Säuren ergab ebenfalls keine höheren Keimzahlen (s. Tabelle 6).

Die keimzahlerhöhende Wirkung des Hefeextraktes (s.Tabelle 7) wird auch im SPC-Agar deutlich, da dieser Stoff vermutlich auch einigen vitaminheterotrophen Bakterien eine Koloniebildung ermöglicht. In Frage kommen

hier allerdings nur die thermostabilen Vitamine, da der Extrakt bei uns mit dem Nährboden autoklaviert wurde.

In Anbetracht der oben aufgeführten Zweifel an der Berechtigung einiger der bisher angewandten Untersuchungsmethoden von Trinkwässern im Plattengußverfahren läge es im Sinne einer Vereinfachung und Normung, die Verwendung des SPC-Agars für die bakteriologische Wasseruntersuchung vorzuschlagen.

Nach dem bisherigen Stand unserer Untersuchungen ist der SPC-Agar bei einer Bebrütungstemperatur von 27°C zumindest für die Wasseruntersuchungen geeignet, bei denen das Erfassen eines möglichst großen Anteiles des Keimspektrums wünschenswert ist.

Welche eventuell neuen Folgerungen sich speziell für die hygienische Bewertung von Wässern ergeben, soll durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

1) Die Entwicklung der Methoden zur Keimzahlbestimmung im hygienisch-bakteriologischen Bereich wurde dargestellt. Es wurde auf die Uneinigkeit hingewiesen, die in Bezug auf die Methodik der Keimzahlbestimmung und der Interpretation deren Ergebnisse besteht. Die heute üblichen Methoden wurden dargelegt.

2) Es wurde die Frage diskutiert, inwieweit der selektionierende Einfluß von Kulturbedingungen auf die erhaltenen Keimzahlen erwünscht ist oder störend wirkt.

3) Die Keimzahlen von einigen Wässern wurden unter verschiedenen Kulturbedingungen bestimmt. Es wurden Zusatzstoffe auf ihre keimzahlerhöhende Wirkung hin untersucht.

4) Der Einfluß der Bebrütungstemperatur auf die erhaltenen Keimzahlen war erheblich. Die Bebrütungstemperatur von 27°C erbrachte höhere Keimzahlen als diejenigen von 22°C und von 37°C. Bei einer Temperatur von 27°C erbrachte ein nährstoffreiches

Medium (SPC-Agar = Glukose-Pepton-Hefeextrakt-Agar) meist höhere Keimzahlen als Fleischextrakt-Pepton-Agar, ein nährstoffarmes Medium (P-Agar) und als Gelatine (diese bei 22°C). Der Zusatz von Glukose und von Salzen organischer Säuren sowie der Ersatz des Pepton durch ein Aminosäuregemisch hatten keinen keimzahlerhöhenden Effekt. Lediglich P-Agar + Hefeextrakt (1g/l) brachte höhere Keimzahlen als P-Agar. Zwischen der Keimzahl verschiedener Wässer nach 6 Tagen Bebrütungszeit auf P-Agar bei 27°C und dem $KMnO_4$-Verbrauch / l konnte keine Beziehung festgestellt werden.

Zur Bestimmung der Anzahl gelatineverflüssigender Keime in Wässern wurde zusätzlich ein Verfahren angewandt, bei dem einem Agarmedium eine geringe Menge Gelatine zugesetzt worden war und die Auszählung gelatineverflüssigender Keime durch ein Fällungsverfahren erfolgte.

5) Der oben erwähnte Glukose-Pepton-Hefeextrakt-Agar (SPC-Agar) übte bei einer Bebrütungstemperatur von 27°C einen geringeren selektionierenden Einfluß auf die Koloniebildung verschiedener im Wasser vorhandenen Keimarten aus als die anderen Kulturmedien und -temperaturen.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

SCHRIFTTUM

ABBA, F.: Zeitschrift f. Hygiene u.Inf. 33, 372-386 (1900)

ANONYMUS: Deutsche Einheitsverfahren, 3.Aufl., K 5, 1960

ANONYMUS: Oxoid Handbuch, Oxoid Limited. 20 Southwark, Bridge Road, London, S.E. 1, 1967

ANONYMUS: Standard Methods for the examination of water and wastewater, 12.Ed. Am.Publ.Health Ass., Inc. N.Y., 1965

ANONYMUS: Manual of Microbiological Methods, Mc.Graw-Hill Book Co., Inc. N.Y., 1957

BEGER, H.: Leitfaden der Trink- und Brauchwasserbiologie. 2.Aufl. G.Fischer, Stuttgart 1966

BOLTON, M.: Zeitschrift f.Hygiene u. Inf. 1, 76 (1886)

BUCKSTEEG: Wasser, Luft und Betrieb, H.9 (1962)

BÜRGER, B.: Grundzüge der Trinkwasserhygiene. Laubsch u. Everth, Berlin 1938

BURMAN, N.P.: Routine Water Bacteriology and its Influence on Engineering Practices. J.Inst.Water Engin. 17, 551-563 (1963)

BURMAN, N.P.: Bakterien im Wasser, Ion Exchange Progress. Deutsche Auflage Nr. 7, Heidelberg, August 1967

CAVALLI-SFORZA, L.: Grundbegriffe der Biometrie. G.Fischer, Stuttgart 1964

COLLINS, V. and C. KIPLING: Enumeration of waterborne bacteria using a new direct count method. Bact. 2o, 2 (1957)

FLÜGGE, C.: Grundriß der Hygiene. 8. Aufl. Veit & Comp., Leipzig 1915

GÄRTNER-REPLOH: Lehrbuch der Hygiene. G.Fischer, Stuttgart 1964

GOTSCHLICH, E.: Handbuch der hygienischen Untersuchungsmethoden. Bd. 1. 1926. G.Fischer, Jena 1926

GROSS, E.: Handbuch der Wasserversorgung, 2.Aufl. v.R. Oldenburg, München und Berlin 193o

HALLMANN, L.: Bakteriologie und Serologie, 2.Aufl. Thieme, Stuttgart 1955

HEINRICH, H., J. KNAACK, K. KUNERTH, CH. MÜLLER, H.-D. MÜNCH, R. SAALBREITER u. H. WEMMER: Vorschlag zu einheitlichen Verfahren für die bakteriologische Wasseruntersuchung. Z.ges.Hyg. 12, 393-4o8 (1966)

HEIM, L.: Bakteriologische Untersuchung und Diagnostik. Ferdinand Enke, Stuttgart 1894

HESSE u. NIEDER: Zeitschrift f.Hygiene u. Inf. 29, 454 (1898)

HESSE, F.: Zentralblatt f.Bakt. 21, 932 (1897)

HERAEUS, W.: Zeitschrift f.Hygiene u. Inf. 1, 193 (1886)

HÖLL, K.: Wasser. Verlag W. de Gruyter & Co., Berlin 1968

JANNASCH, H.W.: Studies of planktonic bacteria by means of a direct membrane filter method. J.gen.Microbiol. 18, 6o9 (1958)

KOCH, R.: Mitteilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, Bd. 1. Norddeutsche Buchdruckerei u.Verlagsanstalt, Berlin 1881

KRUSE, H.: Wasser. Schmorl u.v.Seefeld, Nachf., Hannover 1949

KRUSE, H.: Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, Nr. 14, 1959

LIEBMANN, H.: Handbuch der Frischwasser- und Abwasserbiologie. Verlag R.Oldenburg, München 1962

MALLMANN, W.L., and R.S. BREED: A comparative study of standard agars for determining bacterial counts in water. Americal Journal of Public Health 31, 341-343 (1941)

MEYER, A., F. LANGBEIN, u. H. MÜHLE: Trinkwasser und Abwasser. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1949

MÜLLER, P.TH: Arch. f.Hygiene, 38, 35o (19oo)

MÜLLER, P. TH: Arch. f.Hygiene, 75, 189 (1912)

MÜLLER, R.: Hygiene. Urban u. Schwarzenberg, Berlin u. München 1949

MIGULA, W.: Zentralblatt f. Bakteriologie I, 8, 353 (189o)

NEISSER, M.: Zeitschrift f.Hygiene u.Infektionskrankheiten, 2o, 119 (1895)

OBERZILL, W.: Neuere Erkenntnisse auf dem Gebiet der Chemie u. Mikrobiologie des Wassers. Sciencia Pharmaceutica. Jg. 25, H.2 (1957)

PAKES, W.C.:	Zentralblatt f.Bakt. II, 7, 386 (1901)
POPP, L.:	Hygienische Wasseruntersuchungen. Mitt.Hyg.,Sen.Ges.Berlin, H.2, 1965
RODENWALDT, E., u. R.E. BADER:	Lehrbuch der Hygiene. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1951
RUBNER, M.:	Lehrbuch der Hygiene, 8.Aufl. Deuticke, Leipzig und Wien 1907
SCHARDINGER, F.:	Beitrag zur Hyg. Beurteilung des Trinkwassers. Zbl.f.Bakt. I, 16, 853 (1894)
SCHÜTZ, G.:	Der Reinlichkeitszustand künstlicher und natürlicher Mineralwässer. K.b.Hof- und Univ.-Buchdruckerei, V. Junge & Sohn, Erlangen 1904
SCHWEISFURTH, R., u. BERG:	Schleimbildende Bakterien in Hochbehältern, in Vorbereitung zum Druck.
SCHWEISFURTH, R.:	Zum Problem der Keimzahlbestimmung bei der hygienisch-bakteriologischen Wasseruntersuchung. Gesundheitswesen und Desinfektion 5, 65-70 (1968) Erwiderung von Prof.Dr.med.POPP, Braunschweig, u.Schlußwort von Dr.rer. nat. SCHWEISFURTH. Gesundheitswesen und Desinfektion 7, 100-101 (1968)
SCHWARTZ, W.:	GWF, 14, 443-446 (1954)
SELENKA, F.:	Arch.f.Hygiene u.Bakt. 150, 635 (1967)
SPITTA, D.:	Untersuchung u. Beurteilung des Wassers und Abwassers. Springer, Berlin 1931
STEPHENSON, M.:	Bacterial Metabolism. Longmans Green & Co., 1939,zig.nach ZOBELL, C.E. and C.W. GRANT
TAYLOR, E.W.:	The Examination of Waters and Watersupplies, 7.Aufl. J.u.A. Churchill, London 1958

THOMANN, J.: Z.f. Hyg. u. Inf. 33, 1, (19oo)

WOLTERS, N., u. W. SCHWARTZ: Arch.f.Hydrobiologie, 51, 4, 5oo-541 (1956)

ZOBELL, C.E., and C.W. GRANT: Bacterial activity in dilute nutrient solutions. Science, Aug. 21 (1942)

Herrn Professor Dr.med.,Dr.phil.,Dipl.-Chem.
W. ZIMMERMANN möchte ich an dieser Stelle für
die Überlassung des Themas der vorliegenden
Arbeit sowie für seine freundliche Unterstützung
in Fachfragen danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr.rer.nat. R. SCHWEISFURTH,
der mich bei der Durchführung dieser Arbeit viel-
fach beriet und mich zugleich in die Methodik
der Wasserhygiene und -bakteriologie einführte.

Lebenslauf

Ich wurde als Sohn des Apothekers Hans Lauterbach und seiner Ehefrau Charlotte, geborene Grützner, am 29. 1. 1944 in Breslau geboren. Von 1945 bis 1950 lebte ich mit meinen Eltern in Annaberg/Erzgebirge, von wo wir im Jahre 1950 nach Saarbrücken übersiedelten. Hier besuchte ich vier Jahre die Rothenbergschule, anschließend das Staatliche Ludwigsgymnasium, wo ich im Jahre 1963 das Abitur ablegte. Im selben Jahr begann ich das Medizinstudium an der Universität des Saarlandes. Nach bestandener Ärztlicher Vorprüfung im Oktober 1965 studierte ich zwei Klinische Semester an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Zum Wintersemester 1966/67 setzte ich mein Studium an der Universität des Saarlandes fort und arbeitete im Institut für Hygiene und Mikrobiologie unter der Leitung von Professor Dr. med., Dr. phil., Dipl. Chem. W. Zimmermann an vorliegender Dissertationsschrift. Zum Herbsttermin 1968 legte ich mein Medizinisches Staatsexamen ab. Die Medizinalassistentenzeit beabsichtige ich im Januar 1969 zu beginnen.